

DOI:10.13350/j.cjpb.230625

· 综述 ·

结核分枝杆菌毒力因子 ESAT-6 与巨噬细胞相互作用的研究进展*

赵凤,周钰骐,徐铭吟,张林波,韩鹏**

(吉林农业大学生命科学学院,吉林长春 130118)

【摘要】 ESAT-6 是结核分枝杆菌分泌的重要的毒力因子之一,参与调控巨噬细胞凋亡、自噬、炎症激活等过程。在 ESAT-6 的研究中,多采用有载体协助入膜的重组 ESAT-6 质粒或 ESAT-6 基因敲除/增强菌株或从大肠埃希菌中表达获得的 ESAT-6 重组蛋白等不同形式。因此,本文对 3 种形式的重组 ESAT-6 与巨噬细胞的相互作用进行综述,探讨其对巨噬细胞的影响有何不同,以期对结核病的诊断和疫苗开发提供理论参考。

【关键词】 结核分枝杆菌;ESAT-6;巨噬细胞;作用机制;综述

【中图分类号】 R378.99

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)06-0742-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jun;18(6):742-744, inside back cover.]

Research progress on the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor ESAT-6 and Macrophages

ZHAO Feng, ZHOU Yuqi, XU Minghan, ZHANG Linbo, HAN Peng (*College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China*)

【Abstract】 ESAT-6, one of the major virulence secretions from *Mycobacterium tuberculosis*, gets involved in the regulation of macrophage apoptosis, autophagy, inflammation activation, and other processes. In existing studies on ESAT-6, the recombinant plasmid ESAT-6 with vector-assisted membrane entry, ESAT-6 knockout/enhanced strains, and ESAT-6 recombinant protein generated by *Escherichia coli* expression were discussed. Therefore, in this paper, the interaction between three forms of recombinant ESAT-6 and macrophages was reviewed to discuss how the three forms of recombinant ESAT-6 differ in their effects on macrophages, with the aim to provide theoretical references for the diagnosis and vaccine development of tuberculosis.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; ESAT-6; macrophage; mechanism of action; review

*** 结核病 (Tuberculosis) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 所引起的一种慢性传染性疾病^[1]。据《2021 年全球结核病报告》显示,世界上大约四分之一的人感染了 MTB, 中国是结核病高负担国家之一, 占全球估算结核病例总数的 8.5%, 且发病率呈现上升趋势^[2]。卡介苗 (*Bacillus Calmette-Guérin Vaccine*, BCG) 是牛分枝杆菌的突变株, 是目前唯一有效且广泛使用的结核病疫苗^[3]。巨噬细胞介导的先天免疫反应功能是宿主防御 MTB 的第一道防线, 感染 MTB 后会启动不同死亡机制进行免疫防御^[4]。BCG 与 MTB 基因组相比存在一个 BCG 缺失的区域, 即差异区域 (Region of differences, RD), RD 区分为 16 个区, ESAT-6 是由 RD-1 区 *Rv3875* 基因编码的重要毒力蛋白。ESAT-6 参与调控巨噬细胞凋亡^[5]、炎症激活^[6]、自噬^[7]等过程。关于 ESAT-6 的研究, 多采用不同形式重组 ESAT-6, 如有载体协助入膜的重组 ESAT-6 质粒或 ESAT-6 基因敲除/增强菌株或从大肠埃希菌中表达获得的重组 ESAT-6 蛋白等, 不同形式 ESAT-6 对巨噬细胞的影响及影响程度是否存在差别, 尚无深入研究。因此, 本文对不同形式 ESAT-6 与巨噬细胞的相互作用进行综述, 以期对结核病诊断和疫苗开发提供理论参考。

1 ESAT-6 的介绍

1.1 一般特性 ESAT-6 是 MTB 分泌的 1 种小分子蛋白, 由 RD-1 区的 *Rv3875* 基因编码^[8]。ESAT-6 基因全长 288 bp, 含

95 个氨基酸^[9]。Sorensen 等^[10]通过聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 测得其相对分子质量为 6 ku。ESAT-6 作为 MTB 的保守基因^[11], 只存在于致病性 MTB 中, 在 BCG 和非致病分枝杆菌中均不表达^[12]。此外, ESAT-6 缺乏信号肽序列, 是通过 1 种非信号肽形式分泌到细胞外^[13]。

1.2 免疫特性 ESAT-6 是关键的 T 细胞抗原^[14], 有较强的免疫原性^[15]。细胞介导的免疫反应对控制 MTB 感染至关重要^[16], 清除 MTB 依赖于巨噬细胞杀伤微生物途径的激活、抗原呈递、T 淋巴细胞的激活和 Th1 型细胞因子的释放等^[17]。免疫反应依赖于 MHC II 类分子呈递并激活 CD4⁺ T 细胞, 并促进促炎细胞因子的分泌, 如 TNF 和 IL-12, 以及招募免疫细胞到感染部位的趋化因子, 进一步激活免疫细胞^[18], 还依赖于 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞分泌细胞因子 IFN- γ 活化巨噬细胞。CD8⁺ T 细胞启动不足可能是卡介苗保护效力不足的原因^[19]。

* **【基金项目】** 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目 (No. JJKH20180674KJ); 吉林省大学生创新训练项目 (No. S202210193069)。

** **【通讯作者】** 韩鹏, E-mail: 13341468566@163.com

【作者简介】 赵凤 (1997-), 女, 吉林图们人, 硕士, 主要从事分子病原学与分子免疫学的研究。
Email: zf13104333310@163.com

ESAT-6 能诱发巨噬细胞产生特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞,参与抗 MTB 感染的免疫反应^[20]。因此,ESAT-6 作为一个有前景的疫苗候选分子,在结核疫苗研究中备受关注。

2 ESAT-6 与巨噬细胞的相互作用

2.1 诱导巨噬细胞凋亡 ESAT-6 可诱导巨噬细胞凋亡。细胞凋亡(apoptosis)主要有外源性和内源性 2 种凋亡途径。途径不同但都经过 caspase 家族成员介导蛋白酶级联反应导致凋亡^[21]。内源性凋亡途径:在三磷酸脱氧腺苷(Deoxyadenosine triphosphate, dATP)存在的条件下,细胞色素 C(Cytochrome C, Cyto C)经线粒体释放到细胞浆与凋亡蛋白酶激活因子(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)结合形成多聚体,多聚体与 pro-caspase-9 结合形成凋亡小体,激活 caspase-9,进而激活 caspase-3/7,诱导细胞凋亡^[22]。外源性凋亡途径:主要由肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)超家族的死亡配体如 TNF- α 、FasL、TRAIL 等引发,这些配体和细胞表面死亡受体如 TNF-R1、Fas、TRAIL 结合,进而激活死亡受体募集衔接蛋白 TRADD 或 FADD 与 pro-caspase-8 形成复合物,激活 caspase-8,进而激活 caspase-3/7,同时活化的 caspase-8 会使 Bid 断裂成 tBid, tBid 可诱导 Cyto C 释放,从而将外源性凋亡途径与内源性凋亡途径联系起来^[23]。

2.1.1 重组 ESAT-6 质粒诱导巨噬细胞凋亡 张蕊^[24]通过构建重组真核表达载体 pEGFP-C1-ESAT-6 转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后,RT-PCR 检测凋亡相关基因 caspase-3、caspase-7、caspase-8 和 caspase-9 表达水平显著上调,认为 ESAT-6 通过 caspase 途径诱导 RAW264.7 凋亡。李双双^[25]通过构建真核表达载体 pEGFP-C1-ESAT-6 和原核表达载体 pET-32a-ESAT-6 转染 RAW264.7 后,RT-PCR 检测凋亡相关基因 caspase-3、caspase-7、caspase-8、caspase-9、Bax/Bcl-2 表达水平显著上调,认为 ESAT-6 诱导 RAW264.7 凋亡主要通过线粒体凋亡途径调控 caspase 酶活性及 Bcl-2 家族蛋白的表达。

2.1.2 ESAT-6 基因敲除/增强菌株诱导巨噬细胞凋亡 李岩等^[26]构建表达 ESAT-6 的重组耻垢分枝杆菌感染小鼠巨噬细胞 ANA-1,流式细胞术检测到 ANA-1 凋亡。郝彦斐等^[27]通过构建重组耻垢分枝杆菌 Ag85B-ESAT6-rMs 感染 RAW264.7 后,流式细胞术检测发现 Ag85B-ESAT6-rMs 诱导 RAW264.7 凋亡。屈野^[28]通过构建表达 ESAT-6 的重组 BCG:rBCG-E6 感染 RAW264.7 后,流式细胞术检测发现 rBCG-E6 诱导 RAW264.7 凋亡,且随感染时间细胞凋亡率逐渐升高。

2.1.3 重组 ESAT-6 蛋白诱导宿主巨噬细胞凋亡 Lin 等^[29]用重组 ESAT-6 蛋白与小鼠骨髓源性巨噬细胞 BMDMs 共孵育,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测发现 ESAT-6 以剂量和时间依赖诱导 BMDMs 凋亡,同时检测到活性氧 ROS 生成和 MAPKs 磷酸化增多,Western Blot 检测到 caspase-3 和 caspase-9 蛋白水平升高,认为 ESAT-6 参与 ROS-MAPKs 信号传导并进一步激活内源性凋亡途径诱导 BMDMs 凋亡。Derrick 等^[30]用重组 ESAT-6 蛋白与人单核巨噬细胞 THP-1 共孵育后, FITC-Annexin V/FITC-CI 染色和细胞内半胱天冬酶染色检测发现 ESAT-6 诱导 THP-1 凋亡,RT-PCR 检测到 caspase-1、caspase-3、caspase-5、caspase-7 和 caspase-8 基因表达显著上调,认为 ESAT-6 通过外源凋亡途径激活 caspase 表达诱导 THP-1 凋亡,同时激活 caspase-1 诱导 THP-1 焦亡。Yi

等^[31]从大肠埃希菌中分离纯化获得重组 ESAT-6 蛋白与外周血单核细胞 PBMC 共孵育,Western Blot 检测到 caspase-3 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达水平升高和 Bcl-2 蛋白表达水平降低。Yang 等^[32]通过构建 miR-155 和 SOCS1 过表达载体作用于 RAW264.7, RT-PCR、Western Blot、流式细胞术检测发现,ESAT-6 通过靶向 miRNA155-SOCS1 相互作用促进 RAW264.7 凋亡。

2.2 诱导巨噬细胞焦亡与调节巨噬细胞炎症反应 ESAT-6 可诱导巨噬细胞焦亡,参与调节由巨噬细胞介导的炎症反应。在 MTB 感染巨噬细胞过程中,ESAT-6 能促进细胞 IL-1 β 的分泌。焦亡是一种新发现的程序性细胞死亡过程,此过程依赖于 caspase-1、caspase-4、caspase-5、caspase-11,并伴有大量促炎症因子的释放^[33]。炎症小体如 NLRP3、AIM2 等被激活后与接头蛋白 ASC 和 pro-caspase-1 形成多蛋白复合体,活化 caspase-1 剪切激活 GSDMD,引起细胞肿胀破裂并释放 IL-1 β 、IL-18、HMGB1 等炎症介质,促进炎症反应^[34]。

2.2.1 重组 ESAT-6 质粒诱导巨噬细胞焦亡与调节巨噬细胞炎症反应 唐亦然等^[35]构建可表达结核分枝杆菌 ESAT-6 的 THP-1 细胞系,细胞活性检测和 ELISA 检测,发现 ESAT-6 能够促进细胞的死亡和 IL-1 β 的分泌。张蕊^[24]构建重组真核表达载体 pEGFP-C1-ESAT-6 转染 RAW264.7, RT-PCR 检测炎症相关因子 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 、TNF- α 、GSDMD 等表达量均发生不同程度上调,认为 ESAT-6 可诱导 RAW264.7 发生炎症反应,产生 NLRP3 炎症小体,促进细胞发生焦亡。

2.2.2 ESAT-6 基因敲除/增强菌株诱导巨噬细胞焦亡与调节巨噬细胞炎症反应 Jung 等^[36]用 H37Rv、H37Rv: Δ 3875 (ESAT-6 基因缺失株)、H37Rv: Δ 3875C (ESAT-6 基因补体菌株)感染 BMDMs,检测 IL-1 β 表达,与感染 H37Rv: Δ 3875 的组相比,感染 H37Rv 和 H37Rv: Δ 3875C 的组的 BMDMs 会诱导更多 IL-1 β 的产生。Welin 等^[37]用 H37Rv 和 H37Rv: D3875 (ESAT-6 缺失突变体)感染 THP-1,检测到 H37Rv 会引起细胞 DNA 片段化、线粒体膜电位丧失、质膜完整性丧失,高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 和 IL-1 β 释放增多, caspase-1 活化水平大幅度升高, H37Rv: D3875 则不会,表明 ESAT-6 在激活 caspase-1 诱导 THP-1 焦亡中起重要作用。

2.2.3 重组 ESAT-6 蛋白与宿主巨噬细胞炎症反应 王健宏等^[38]用大肠埃希菌表达并纯化获得的重组 ESAT-6 蛋白处理 RAW264.7,通过流式细胞术检测到细胞发生凋亡,通过 Western Blot 检测到细胞凋亡蛋白 caspase-3、caspase-8、CHOP、Bad 及炎症小体 AIM2 和 ASC 的表达增多,说明 ESAT-6 能引起的巨噬细胞的凋亡,也能激活炎症小体 AIM2、ASC 导致焦亡。Jung 等^[36]用重组 ESAT-6 蛋白处理 BMDMs, Western blot、免疫荧光染色和共聚焦显微镜分析,发现 ESAT-6 通过激活信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 刺激 BMDMs 产生 IL-6。

2.3 抑制巨噬细胞自噬 自噬是一种溶酶体清除机制,可以调控巨噬细胞清除 MTB,在免疫反应中发挥重要作用^[39]。诱导巨噬细胞的自噬能有效杀伤 MTB^[40]。活性氧(ROS)是重要的炎症体激活信号,ROS 通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和细胞外信号调节蛋白激酶 1 和 2 (ERK1/2) 激活炎症小体^[41]。抑制自噬并导致功能失调的线粒体聚集,导致活性氧生成增

强,从而激活炎症小体^[42]。

2.3.1 重组 ESAT-6 质粒抑制巨噬细胞自噬 徐雪维等^[43]用重组真核表达质粒 pCMV-HA-ESAT6 转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后,通过 Western Blot 检测细胞中 LC3 I 和 LC3 II 的表达,发现 LC3 I 向 LC3 II 转换逐渐增强,且 LC3 II 的增加呈现时间依赖性,说明 ESAT-6 会抑制小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞内的自噬水平。赵润鹏等^[40]通过构建重组质粒 pCMV-HA-ESAT6 转染 RAW264.7 细胞后,发现 ESAT-6 可以通过诱导哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的激活,抑制溶酶体与自噬小体的融合,从而抑制自噬。

2.3.2 重组 ESAT-6 蛋白抑制巨噬细胞自噬 Behura 等^[44]用重组 ESAT-6 蛋白作用于 THP-1,检测 miR-30a-3p 和 miR-30a-5p 的变化,发现 ESAT-6 通过调节 miR-30a-3p 和 miR-30a-5p 的表达抑制细胞自噬,从而提高分枝杆菌在细胞内存活率。Yabaji 等^[45]用重组 ESAT-6 蛋白作用于小鼠单核巨噬细胞 J774A.1,发现 ESAT-6 通过诱导细胞线粒体超氧化物歧化酶(SOD-2)的表达和活性增强,抑制自噬反应。

3 ESAT-6 在结核病疫苗开发的应用

2021 年是第一个结核病疫苗-BCG 诞生一百周年^[46]。BCG 虽被广泛用于预防结核病,但其保护效力仍有不足^[47],因此,急需一种更加有效的疫苗,以为所有年龄段都可以提供有效的保护。Clemmensen 等^[48]通过在小鼠慢性感染 MTB 期间筛选了 62 种可识别 MTB 的抗原,并在此背景下确定了 4 种最具免疫优势抗原(MPT70、Rv3020c、Rv3019c 和 ESAT-6)结合到亚单位疫苗中,这种新疫苗在标准短期模型和卡介苗免疫力下降的长期感染模型中都表现出强有力的保护,并且他们认为,疫苗的持续保护现象完全取决于 ESAT-6 的存在。Heijmenberg 等^[49]通过构建新菌株 BCG; ESAT6-PE25SS,靶向输出 ESAT-6 进行试验,结果显示,与 BCG; ESX1^{MTB} 相比,BCG; ESAT6-PE25SS 安全性更高,对结核病的保护效果更好。张真等^[50]通过构建结核分枝杆菌 Hsp65-ESAT6 DNA 候选疫苗株,免疫 C57BL/6 小鼠,发现 Hsp65-ESAT6 DNA 疫苗株可激发较强的免疫反应,并诱导机体产生分泌高水平 TNF- α 的 Th 型免疫应答,为新型结核 DNA 疫苗研制提供了实验依据。

4 展望

结核病因传染源不易控制、传染性强、治疗困难等原因,对世界公共卫生健康存在严重威胁。MTB 感染巨噬细胞后,巨噬细胞会通过多种途径抵抗或杀伤 MTB,但 MTB 也会通过多种途径逃避巨噬细胞的杀伤^[51]。不同形式 ESAT-6 均可诱导巨噬细胞凋亡、焦亡、参与调节巨噬细胞炎症反应、抑制自噬。ESAT-6 作为 MTB 分泌的重要毒力蛋白之一,是抗结核免疫的靶抗原,具有 MTB 记忆免疫应答的主要抗原,可在 MTB 感染诊断与疫苗开发提供理论基础。

【参考文献】

[1] 鲁学萍,穆廷杰. 我国耐药结核病的诊疗及研究现状[J]. 疾病预防控制通报,2020,35(2):81-85.

[2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021[EB/OL],2021,10-14.

[3] Luca S, Mihaescu T. History of BCG Vaccine[J]. Medica,2013,8

(1):53-58.

[4] 丁志鑫,车南颖,张旭霞,等. 结核分枝杆菌差异区基因功能研究及其应用进展[J]. 临床肺科杂志,2012,17(3):505-508.

[5] Belogorodtsev SN, Nemkova EK, Stavitskaya NV, et al. Pathogenic effects of *M. tuberculosis*-specific proteins ESAT-6 and CFP-10 in macrophage culture and in 3D-Granulemogenesis model *in vitro*[J]. Bull Exp Biol Med,2021(171):656-660.

[6] Wong KW, Jacobs WR Jr. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Cell Microbiol,2011,13(9):1371-1384.

[7] Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2003,10(13):12420-12425.

[8] 陈玮. 结核分枝杆菌 ESAT-6 抗原蛋白[J]. 国外医学. 流行病学传染病学分册,2000(3):101-105.

[9] 何宗林,杜先智. ESAT6 在结核病中的最新研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(6):663-665.

[10] Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 1995,63(5):1710-1717.

[11] Mahghani GA, Kargar M, Ghaemi EA, et al. Role of ESAT-6 in pathogenicity of Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates [J]. Microb Pathog, 2021, 162 (1): 1 05366.

[12] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG [J]. Infect Immun, 1996,64(1):16-22.

[13] 王英,王雪梅,方强. 结核分枝杆菌 ESAT6 疫苗的研究进展[J]. 淮海医药,2013,31(6):576-579.

[14] Andersen P, Andersen AB, Srensen AL, et al. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice [J]. Immunology,1995,154(7):3359-3372.

[15] 马晓红,张育华. 结核分枝杆菌 ESAT6 基因的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2008(11):852-854.

[16] Pollock JM, Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle[J]. Infect Immun,1997,65(7):2587-2592.

[17] Medha, Priyanka, Sharma S, et al. Design of a peptide-based vaccine from late stage specific immunogenic cross-reactive antigens of PE/PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Eur J Pharm Sci,2021(168):106051.

[18] Bettencourt P, Muller J, Nicastrì A, et al. Identification of antigens presented by MHC for vaccines against tuberculosis [J]. NPJ Vaccines,2020(5):2.

[19] Sud D, Bigbee C, Flynn JL, et al. Contribution of CD8⁺ T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Immunol,2006(176):4296-4314.

[20] Kumar K, Tharad M, Ganapathy S, et al. Phenylalanine-rich peptides potentially bind ESAT6, a virulence determinant of *Mycobacterium tuberculosis*, and concurrently affect the pathogen's growth[J]. PLoS One,2009,4(11):e7615.

- [21] 郭双,邢栋,吕勃. 细胞凋亡及细胞程序性坏死和细胞焦亡的研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2021,35(3):321-324.
- [22] 汪静,汪芳. 关于细胞死亡方式的研究进展[J]. 实用医药杂志,2006(10):1250-1252.
- [23] 张晓晖,姚天明,黄高昇,等. 细胞凋亡的最新研究进展[J]. 第四军医大学学报,2002(S1):42-44.
- [24] 张蕊. 结核杆菌 ESAT-6 和 CFP-10 对巨噬细胞 NLRP3 炎性小体形成的影响及相关机制研究[D]. 长春:吉林农业大学,2018.
- [25] 李双双. 结核分枝杆菌 CFP-10、ESAT-6 及 CFP-10-ESAT-6 对 RAW264. 7 细胞凋亡及相关机制的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2017.
- [26] 李岩,鲍朗,张会东,等. 表达结核杆菌 ESAT-6 基因重组耻垢分枝杆菌的构建及其功能研究[J]. 南方医科大学学报,2006(7):923-926.
- [27] 郝彦斐,罗泰来,王平,等. 重组耻垢分枝杆菌 Ag85B-ESAT6-rMs 对小鼠巨噬细胞功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(4):361-363.
- [28] 屈野. 结核分枝杆菌 ESX-1 分泌蛋白调控巨噬细胞功能的研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2013.
- [29] Lin J,Chang Q,Dai X,et al. Early secreted antigenic target of 6-kDa of *Mycobacterium tuberculosis* promotes caspase-9/caspase-3-mediated apoptosis in macrophages[J]. Mol Cell Biochem,2019,457(1-2):179-189.
- [30] Derrick SC,Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression[J]. Cell Microbiol,2007,9(6):1547-1555.
- [31] Yi N,Jung BG,Wang X,et al. The early secreted antigenic target of 6 kD of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits the proliferation and differentiation of human peripheral blood CD34 cells[J]. Tuberculosis (Edinb),2016(101S):S28-S34.
- [32] Yang S,Li F,Jia S,et al. Early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis of macrophages via targeting the microRNA155-SOCS1 interaction[J]. Cell Physiol Biochem,2015,35(4):1276-12888.
- [33] 胡颖超,杨硕. 细胞焦亡的研究进展[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2021,41(8):1245-1251.
- [34] 林文,曹珈琪,张燕,等. 细胞焦亡的分子机制及研究进展[J]. 中国当代医药,2020,27(27):25-29.
- [35] 唐亦然,戴鑫钧,胡燕萍,等. 可诱导表达结核分枝杆菌 ESAT-6 的 THP-1 细胞系的建立[J]. 中国兽医学报,2021,41(11):2148-2154.
- [36] Jung BG,Wang X,Yi N,et al. Early secreted antigenic Target of 6-kDa of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates IL-6 production by macrophages through activation of STAT3[J]. Sci Rep,2017(7):40984.
- [37] Welin A,Eklund D,Stendahl O,et al. Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing *M. tuberculosis* undergo caspase-1 and cathepsin B-independent necrosis[J]. PLoS One,2011,6(5):e20302.
- [38] 王健宏,徐兆坤,李武. 结核分枝杆菌 CFP10 和 ESAT6 对巨噬细胞 RAW264. 7 凋亡及 AIM2/ASC/Caspase-8 通路的影响[J]. 微生物学通报,2020,47(12):4113-4121.
- [39] 孙万里,郭玉琪,王月,等. JNK/MAPK 通路在结核杆菌感染的巨噬细胞凋亡、自噬中的作用机制研究[J]. 临床肺科杂志,2021,26(10):1467-1471.
- [40] 赵润鹏,吴静,胡东. 结核分枝杆菌感染的巨噬细胞的死亡和自噬[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(12):1711-1714.
- [41] Harijith A,Ebenezer DL,Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation [J]. Front Physiol,2014,29(5):352.
- [42] Jo EK. Autophagy as an innate defense against mycobacteria [J]. Pathog Dis,2013,67(2):108-118.
- [43] 徐雪维,赵润鹏,张荣波,等. 6 kD 早期分泌型抗原靶点 (ESAT6)抑制巨噬细胞的自噬并促进 BCG 的增殖[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2017,33(3):310-314.
- [44] Behura A,Mishra A,Chugh S,et al. ESAT-6 modulates Calcimycin-induced autophagy through microRNA-30a in *mycobacteria* infected macrophages[J]. Infect,2019(79):139-152.
- [45] Yabaji SM,Dhamija E,Mishra AK,et al. ESAT-6 regulates autophagous response through SOD-2 and as a result induces intracellular survival of *Mycobacterium bovis* BCG [J]. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom,2020,1868(10):140470.
- [46] 舒薇,孙巧贤,张立杰,等. 结核病的研究与创新-2021 年世界卫生组织全球结核病报告解读[J]. 中国防痨杂志,2022,44(1):45-48.
- [47] Mustafa AS. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis[J]. Mol Immunol,2002,39(1-2):113-119.
- [48] Clemmensen HS,Knudsen NPH,Billeskov R,et al. Rescuing ESAT-6 Specific CD4 T cells from terminal differentiation is critical for long-term control of murine MTB infection[J]. Front Immunol,2020,6(11):585359.
- [49] Heijmenberg Isis,Husain Aliabbas,Sathkumara Harindra Det,et al. ESX-5-targeted export of ESAT-6 in BCG combines enhanced immunogenicity & efficacy against murine tuberculosis with low virulence and reduced persistence[J]. Vaccine,2021,39(50):7265-7276.
- [50] 张真,赵玲娜,申梦,等. 结核分枝杆菌 Hsp65-Ag85B、Hsp65-ESAT6 融合基因 DNA 疫苗株的构建及免疫原性研究[J]. 免疫学杂志,2020,36(2):109-115.
- [51] 杨瑞丽,孙佳楠,陆伟. 结核分枝杆菌对宿主巨噬细胞死亡方式的调控[J]. 生命科学,2013,25(11):1084-1088.

【收稿日期】 2022-12-26 【修回日期】 2023-03-01